

博士論文要旨（日本語）

ヘテロシスト形成型シアノバクテリアと紅色光合成細菌における ニトロゲナーゼによる水素生産 Nitrogenase-based hydrogen production by heterocystous cyanobacteria and purple photosynthetic bacteria

神奈川大学大学院理学研究科
生物科学専攻
佐藤 剛 (201470173)

【第一章 序論】

近年、大気中の二酸化炭素を含む温室効果ガス濃度の上昇による気候変動への悪影響が懸念されており、化石燃料を代替する再生可能エネルギー資源の創出が望まれている。水素は燃料電池により電気を取り出すことができ、この際の廃棄物は水である。水素を主要な燃料とする「水素社会」の実現のための研究は、我が国においても NEDO 等により積極的に推進されており、無機触媒や半導体などを利用した、いわゆる「人工光合成」や、光合成微生物を利用した「光生物学的水素生産」の研究が行われている。

光合成微生物による水素生産は光合成の電子供与体として水を使う酸素発生型光合成生物であるシアノバクテリアや緑藻による水素生産と硫黄化合物や有機物を電子供与体とする非酸素発生型光合成生物である光合成細菌による水素生産に大きく分けられる。光合成微生物が持つ水素生産に関与する酵素には、ニトロゲナーゼとヒドロゲナーゼが知られているが(1)、どちらも酸素感受性で、酸素存在下では失活しやすい。ニトロゲナーゼは、空気中の窒素ガスをアンモニアへと固定する酵素であるが、式 1（窒素固定反応）のように必然的な副産物として水素が発生する。

$$\text{N}_2 + (6+2n) \text{H}^+ + (6+2n) \text{e}^- + 2(6+2n) \text{ATP} \rightarrow 2\text{NH}_3 + n\text{H}_2 + 2(6+2n) (\text{ADP}+\text{Pi}) \text{ (ただし } n \geq 1)$$
(式 1)

また、窒素ガスが存在しないアルゴン(Ar)気相下などでは、投入された全ての電子が水素生産に向かう。ニトロゲナーゼは多量の ATP を消費するため理論的な最大エネルギー変換効率は低い、ヒドロゲナーゼと異なり酸素存在下でも不可逆的に水素を生産できる利点がある。酸素発生型光合成生物であるシアノバクテリアでは酸素発生を伴う光合成と嫌気性酵素による水素生産の両立が難しいが、アナベナ等のヘテロシスト形成型シアノバクテリアは数十個の細胞が連なって糸状体を形成し、窒素飢餓条件下で栄養細胞の一部がヘテロシストと呼ばれる細胞へと分化し、その内部でニトロゲナーゼを発現する。ヘテロシストは酸素発生を行う光化学系 II を欠き、呼吸活性もあり、内部が嫌気状態に保たれ酸素感受性のニトロゲナーゼの活性を保護している。ま

たヘテロシストには、取込み型ヒドロゲナーゼ(uptake hydrogenase: Hup)があり、ニトロゲナーゼによって生産された水素を再吸収してしまうが、我々の研究グループは、Hup を遺伝子工学的に不活性化することにより、水素を酸素の共存下でも長期にわたり生産蓄積できることを示した(2,3)。しかし、将来的に化石燃料を代替するレベルでのシアノバクテリアによる水素生産を実現するためには、水素生産への光エネルギー変換効率の向上、安価で大規模なバイオリアクターの開発など、様々な課題を克服しなければならない。

本論文では、単位面積当たりの水素生産量を増やすことを目的として、既存のシアノバクテリア変異株を親株として、さらなる遺伝子工学的改良を施すことにより、水素生産性が向上した改良株が作製できるか検討した(第二章)。次に、シアノバクテリアは地表に到達する全太陽光スペクトルのうち可視部を利用するが、紅色光合成細菌は可視光よりも長波長側の近赤外光も利用する。光合成有効波長の異なる二つの光合成生物を組み合わせることで、水素生産性が向上することが期待できる。そこで、まず、紅色光合成細菌においても取込み型ヒドロゲナーゼ Hup の遺伝子破壊がどの程度水素生産の向上に有効であるかどうか検討するために、その遺伝子破壊株を作製し、水素生産活性について評価した(4)(第三章)。さらに、シアノバクテリアと紅色光合成細菌の培養層を重層したバイオリアクターの開発に向けて、第三章で作製した紅色光合成細菌の Hup 破壊株とシアノバクテリアの Hup 破壊株の培養層を積層させた時の水素生産活性について評価した(第四章)。

【第二章】

Aanabaena、*Nostoc* 属等のシアノバクテリアは、硝酸塩類などの窒素栄養源が欠乏した条件下では、通常の酸素発生型光合成を行う栄養細胞の一部が、約 10-20 細胞の間隔で異型細胞(ヘテロシスト)へと分化し、そこでニトロゲナーゼ反応を行う(5)。ヘテロシストは厚い細胞壁および活発な呼吸により酸素濃度を低く保つことができ、ニトロゲナーゼの活性が保持されている。ヘテロシストは光化学系 II を欠くため光合成による酸素発生が起らず、反応に必要な電子は隣接する栄養細胞から供給される糖質に依存する。多くの窒素固定能を有する細菌が持つニトロゲナーゼはモリブデン(Mo)を触媒活性部位に持つタイプ(Mo 型)であるが、一部の細菌は Mo 型に加えて、Mo に代わりに中心金属がバナジウム(V)に置き換わったタイプ(V 型)を持つものがある。V 型は Mo 型に比べ、 N_2 還元反応に対する電子配分比率が低く、副反応である H^+ 還元反応(H_2 生産)への電子配分比率が高いと報告されている(6)。通常の培養条件では Mo 型が優先的に発現し、Mo 欠乏状態にならないと V 型が発現しないため、V 型の正味の触媒活性および水素生産活性を調べるには工夫が必要となる。

そこで本研究では、光生物学的水素生産における V 型ニトロゲナーゼの利用の有効性を検討するため、V 型が優先的に発現する遺伝子組み換え体の作製を試みた。まず、Mo 型および V 型遺伝子を保有し、ニトロゲナーゼ活性の高い *Nostoc* sp. PCC 7422 の Hup 遺伝子破壊株を材料株とし、Mo 型ニトロゲナーゼの構成要素の一つである NifH を遺伝子破壊した株を作製した。*Nostoc* sp. PCC 7422 の *nifH* 遺伝子周辺の塩基配列情報は Sasaki らが一部明らかにしている(私信)。その情報をもとに、Mo 型ニトロゲナーゼを構成する蛋白質の一つである、鉄蛋白質 NifH

をコードする *nifH* 遺伝子を挿入破壊遺伝子のターゲットと決め、*nifH* 内に抗生物質耐性遺伝子を挿入することを試みた。培養気相中の水素の体積比組成分析はガスクロマトグラフィー (Shimadzu, GC-2014) により行った。カラムにはゼオライト皮膜キャピラリーカラム (RESTEK、Rt-Molesieve5A [30 m × I.D. 0.53 mm])、検出器には熱伝導検出器 (TCD)、キャリアーガスにはアルゴンガス (圧力 206.9 kPa) を用いた。継時的な培養を行いながら、ガスタイトシリンジ (SGE、250R-GT) で気相のガスサンプルを 50 μ L 抜き取り測定を行った。作製した Δ Hup Δ NifH 株は窒素固定条件下で増殖が確認できず、ニトロゲナーゼ活性や水素発生活性も見られなかった。この結果から、*nifH* の分断破壊方法によって Mo 型ニトロゲナーゼが機能しなくなったことが示されたが、同時に Mo 型ニトロゲナーゼの機能を破壊しただけでは、代替ニトロゲナーゼである V 型ニトロゲナーゼの発現の抑制が解除されないことも示唆された。

次に、Mo 型のみを保有する *Anabaena/Nostoc* sp. PCC 7120 の Hup 遺伝子破壊株を親株にして *nifHDK* 遺伝子をゲノム DNA から取り除き Mo 型の機能を破壊した *Anabaena/Nostoc* sp. PCC 7120 Δ Hup Δ Nif 株を材料株にした。この株は構造遺伝子が取り除かれているため、窒素固定条件下では生育できないが、*nifH* の上流に位置するプロモーターは存在している。このプロモーターの下流に *A. variabilis* ATCC 29413 株由来の V 型ニトロゲナーゼ遺伝子 *vnfDGKEN* を導入させた変異株を作製した。これらの遺伝子を導入した株である VDN-4 株は窒素欠乏条件下でも生育でき、2 つの気相下における水素生産実験でも明瞭に水素の蓄積が認められた。この結果から、導入した V 型ニトロゲナーゼ遺伝子が VDN-4 株内で発現し、同酵素によって窒素固定及び水素生産が行われていることが示唆された。

【第三章】

紅色光合成細菌は、プロテオバクテリア門に属し光合成能を持つ細菌種を包括的に含む名称である。プロテオバクテリア門はさらに五つのサブグループに分類され、そのうち、 α -プロテオバクテリア、 β -プロテオバクテリア、 γ -プロテオバクテリアの三つのサブグループで紅色光合成細菌が見つかっている。紅色光合成細菌もシアノバクテリアや他の窒素固定生物と同様、幅広くニトロゲナーゼを保有しているが、シアノバクテリアと異なる点は水を電子供与体として利用せず、乳酸やピルビン酸等の有機酸を電子供与体としていることである。そのため、窒素固定をする際は、有機酸を酸化させることで NADH のような還元力に変換し、これを窒素固定に利用している。また、紅色光合成細菌の多くは、シアノバクテリアと同様、取込み型ヒドロゲナーゼ (Hup) 遺伝子を保有しており、生産された水素の再酸化 (吸収) が起きるため、水素生産効率はある程度制限される。これまで Hup の遺伝子破壊については α -プロテオバクテリアや γ -プロテオバクテリアに属する株を用いて研究されてきたが β -プロテオバクテリアではこれまで報告されていなかった。そこで本研究では、水素生産性が詳しく調べられていない β -プロテオバクテリアに属する *Rubrivivax gelatinosus* IL144 株を研究材料とし、同株の水素生産活性を高める目的で Hup 遺伝子破壊株の作製を試みた。Hup 遺伝子破壊用プラスミドを、大腸菌 S17-1 λ pir 株を供与菌とする接合伝達により *Rubrivivax gelatinosus* IL144 株へ導入した。Km を含む培地で一点交差組換え体を選抜し、その後二点交差組換えを起こさせるために Km を含まない PYS 培地で好氣的に

培養した。次に、15%のスクロースを含む PYS 培地で二点交差組換え体を選抜した。培養気相中の水素の体積比組成分析はガスクロマトグラフィー (Shimadzu, GC-2014) により行った。カラムにはゼオライト皮膜キャピラリーカラム (RESTEK, Rt-Molesieve5A [30 m × I.D. 0.53 mm])、検出器には熱伝導検出器 (TCD)、キャリアーガスにはアルゴンガス (圧力 206.9 kPa) を用いた。継時的な培養を行いながら、ガスタイトシリンジ (SGE, 250R-GT) で気相のガスサンプルを 50 μ L 抜き取り測定を行った。作製された破壊株は、生育条件によっては野生株に対して 30%程度水素生産活性が増大することが明らかになった。

【第四章】

シアノバクテリアや藻類、植物のような酸素発生型光合成を行う生物は光化学系 I および光化学系 II と呼ばれる二つのタイプの光化学反応中心を持っている。これら二つの光化学系は反応中心複合体の主要な光を補足する色素としてクロロフィル α (Chl α) を使用し、可視光と呼ばれる、400 – 700 nm の波長領域の光を利用することができる。太陽光エネルギーのうち、この波長領域に該当する部分は光合成有効放射 (Photosynthetically active radiation, PAR) として知られ、地球表面が受ける太陽光エネルギー全体の 45%を占める。そして、残りの 55%の多くは近赤外光が占めている。Chl α を持つ光合成生物は、近赤外光の大部分を利用できない。対照的に紅色光合成細菌のような酸素非発生型の光合成を行う原核生物は主要な光合成色素としてバクテリオクロロフィル α (BChl α) または BChl b を使用し、400 – 900 nm 付近 (BChl b では ~1100 nm) の波長領域の光を光合成に利用することができる。これらの光合成生物は一つのタイプのみの反応中心を持ち、電子供与体としては水を利用できず、代わりに、乳酸やコハク酸等様々な有機酸を光合成代謝経路の中で電子供与体として利用している。

自然の生態系の中では、微生物マット等のように、シアノバクテリアの層の下に光合成細菌が生息していることが報告されており、このような光合成細菌はシアノバクテリアが吸収できず透過した光のみを利用して生きていることを示唆している。700 – 900 nm の近赤外光は地球表面が受けるエネルギーの約 18%を含むため、この領域の光を光生物学的水素生産に利用できれば、単位面積当たりの水素生産量を増大させることが可能と考えられる。

そこで本実験では、自然の生態系を模倣し、シアノバクテリアと紅色光合成細菌を使用して積層培養し、シアノバクテリアの培養層を透過した光による紅色光合成細菌の水素生産および光生物学的水素生産における積層バイオリクターの有効性について検討した。非窒素含有培地でニトロゲナーゼ発現を誘導させたシアノバクテリアまたは紅色光合成細菌の菌体液をカルチャーフラスコ内に入れ、ブチルゴム栓で密閉した後、気相をアルゴンガスで置換した。菌体液が入ったカルチャーフラスコを二層に重ね、真上からハロゲンランプにより照射した。カルチャーフラスコの外側はアルミテープで覆い、上層の菌体液を透過する光のみが下層に行くようにした。また、積層させたバイオリクターを自然光が届くガラス張り天井の屋内施設にも設置し、その他の条件が同じになるようにして培養した。培養気相中の水素の体積比組成分析はガスクロマトグラフィー (Shimadzu, GC-2014) により行った。カラムにはゼオライト皮膜キャピラリーカラム (RESTEK, Rt-Molesieve5A [30 m × I.D. 0.53 mm])、検出器には熱伝導検出器 (TCD)、キャ

リアーガスにはアルゴンガス（圧力 206.9 kPa）を用いた。継時的な培養を行いながら、ガスタイトシリンジ（SGE、250R-GT）で気相のガスサンプルを 50 μ L 抜き取り測定を行った。

シアノバクテリアの培養層を二つ重ねた時と比べ、下層を紅色光合成細菌の培養層に変えることで単位面積当たりの水素生産量が 2.7 倍近く増大した。

【第五章】

本章においては前章までの研究を踏まえて、本研究の総括、議論を行った。本研究は、経済的な光生物学的水素生産の実現を目指し、単位面積当たりの水素生産量の増大を目指し、まず、既に作製されているヘテロシスト形成型シアノバクテリアの変異株から、さらに水素生産活性を高めた株をつくるため、代替ニトロゲナーゼである V 型ニトロゲナーゼを優先的に発現する株の作製を試みた(第二章)。Mo 型と V 型を持つ *Nostoc* sp. PCC 7422 の Mo 型ニトロゲナーゼを NifH の遺伝子破壊により発現できなくした変異株では、Mo 型の失活だけでは V 型の発現誘導が起きず、これまで *Anabaena* 属でのみ報告されていた V 型発現の抑制機構が *Nostoc* 属のシアノバクテリアにも存在していることが示唆された。また、培地中に含まれる Mo を限りなく除去して V 型を発現誘導させても、その水素生産活性は Mo 型よりも低く、Mo 除去等の作業と合わせて実用性に乏しいことが示唆された。

次に *Anabaena/Nostoc* sp. PCC 7120 の Mo 型遺伝子を V 型遺伝子と置き換える研究では、V 型の構造遺伝子およびクラスター合成遺伝子の一部を導入することでその水素生産活性が見られた。その値は Mo 型の活性近くまで届き、今後の改良次第では大きく超える可能性も示唆された。今回の導入方法を利用することで、たとえば、導入する V 型の遺伝子の組み合わせを変えることでさらに水素生産能力が向上するかもしれない。また、ニトロゲナーゼの中には Mo 金属も V 金属もクラスターに含まない Fe-only 型ニトロゲナーゼが知られている。シアノバクテリアではこのニトロゲナーゼ遺伝子を持つ種は見つかっていないが、一部の紅色光合成細菌ではこの遺伝子を持つ種が見つかっている。シアノバクテリアに Fe-only 型ニトロゲナーゼの遺伝子群を導入することで、水素生産能力を向上できるかどうか検討することは今後の研究課題である。

第三章では、近赤外光を利用して光合成を行う紅色光合成細菌の Hup 遺伝子破壊を試み、 β -プロテオバクテリアにおいても遺伝子破壊によって水素生産活性が高まることが明らかになった。これまで β -プロテオバクテリアで Hup の遺伝子破壊に関する報告はなく、今回の実験結果は紅色光合成細菌を利用した水素生産を検討する上で大きく役に立つものであると考えられる。プロテオバクテリアに属する細菌は生態、形態、代謝生理など多様性が非常に大きい。紅色光合成細菌を利用した水素生産の研究は、主に α -プロテオバクテリアに属する紅色光合成細菌に属する種で行われてきた。本研究では、あまりされていなかった β -プロテオバクテリアに属する紅色光合成細菌も光生物学的水素生産に利用できる可能性を示した。第四章ではシアノバクテリアと第三章で作製した紅色光合成細菌の Hup 遺伝子破壊株の培養層を積層させることにより、水素生産に利用する有効波長領域を拡大できるか検討し、シアノバクテリアの培養層を透過した光を用いた紅色光合成細菌の水素生産活性を評価した。本研究で、上層にシアノバクテリア、下層に紅色光合成細菌をおいた組み合わせが最も下層の水素生産量が高く、Chl α および BChl α の

特性を有効に利用できた。この成果によって、多層型のバイオリアクターの有用性がデータによって始めて示された。バイオリアクターを設計する上で基盤となる知見を得ることができた。

経済性を有し、化石燃料をある程度代替できるスケールでシアノバクテリアや紅色光合成細菌などの光合成微生物を利用した光生物学的な水素生産の実現には、多くの克服すべき課題が多い。しかし、人類社会の持続的発展のためにはこの分野の研究を推進する必要があると考える。

【参考文献】

- (1) Tamagnini P, *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, 66, 1-20
- (2) Masukawa H, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 58, 618-624
- (3) Yoshino F, *et al.*, *Mar. Biotechnol.* **2007**, 9, 101-112
- (4) Sato T, *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **in press**
- (5) Wolk CP, *et al.*, In: *The molecular biology of cyanobacteria*, Springer **1994**, 769-823
- (6) Eddy RR, *et al.*, *J. Biochem.* **1987**, 244, 197-207